การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์กับความหวานด้วยเทคนิค Target Region Amplification Polymorphism Polymerase Chain Reaction (TRAP-PCR) ในพืชกลุ่มแตง *Cucumis melo* L.

Study of genetic diversity and marker-trait association for sweetness by Target Region Amplification Polymorphism Polymerase Chain Reaction (TRAP-PCR) in *Cucumis melo* L.

แสงเดือน อินชนบท[1], ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์[1], วราภรณ์ แสงทอง[1], ประวิตร พุทธานนท์[2] และ แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1*]

Sangduen Inchonbot[1], Chotipa Sakulsingharoj[1], Varaporn Sangtong[1], Prawit Puddhanon[2] and Saengtong Pongjaroenkit [1*]

[1]*สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้*

[2]*สาขาวิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้*

[1]*Program of Genetics, Faculty of Science, Maejo University,*

[2]*Program of Agronomy, Faculty of Agricultural Production, Maejo University*

Received : 26 March 2018

Accepted : 23 May 2018

Published online : 31 May 2018

บทคัดย่อ

แตงกลุ่ม Cucumis melo (*C. melo* L.) เป็นพืชที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจเพิ่มมากขึ้น และมีความต้องการพันธุ์ที่มีรสชาติดีเหมือนแตงเมลอน ทนทานต่อโรค แมลง และสภาพอากาศ เหมือนแตงไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและศึกษาความสัมพันธ์กับความหวานของแตงในกลุ่มนี้ ด้วยเทคนิค Target Region Amplification Polymorphism Polymerase Chain Reaction (TRAP-PCR) โดยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีนในวิถีเมทาบอลิซึมของน้ำตาลของแตงเมลอน จำนวน 9 ยีน ร่วมกับไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 12 ไพรเมอร์ พบว่าคู่ไพรเมอร์ จำนวน 59 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้แถบดีเอ็นเอ จำนวน 379 แถบ เมื่อนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม พบแตง *C. melo* L. มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.69 ถึง 0.95 และที่ค่าสัมประสิทธ์ความเหมือน Jaccard เท่ากับ 0.8 สามารถจัดกลุ่มแตงออกเป็น 3 กลุ่ม ที่สอดคล้องกับความหวาน (% brix) ในขณะที่ผลการศึกษาความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะความหวาน จากแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic bands) จำนวน 220 แถบ คิดเป็น 58.05 เปอร์เซ็นต์ พบเครื่องหมาย CM01 (X174) แสดงความเชื่อมโยงและมีอิทธิพลกับความหวานเป็น 87.07 เปอร์เซ็นต์ โดยเป็นเครื่องหมายที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ Neutral invertase 1 กับ Sa17_800 โดยผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาได้นี้จะสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ของแตงกลุ่ม *C. melo* L. ต่อลักษณะความหวานให้มีประสิทธิภาพ แม่นยำ และรวดเร็วมากขึ้นต่อไป

คำสำคัญ : แตงกลุ่ม *Cucumis melo* L. , เทคนิค Target Region Amplification Polymorphism Polymerase Chain Reaction (TRAP-PCR), ความหลากหลายทางพันธุกรรม, เครื่องหมายโมเลกุล, ความหวาน

***Corresponding author. E-mail**: saengton@mju.ac.th

Abstract

Cucumis melo (*C. melo* L.) groups is an important plant with increasing economic value. The improvement of the varieties with great tastes like melon and resistance to insect and unfavorable weather conditions similar to Thai-melon has been needed. This research aimed to study genetic diversity and relationship between molecular markers and sweetness trait of *C. melo* L. by using Target Region Amplified Polymorphism Polymerase Chain Reaction (TRAP-PCR) technique. Specific primers which were designed based on the sequence of nine genes involving in metabolic pathway of sugar combining with twelve arbitrary primers were used in TRAP-PCR. It was found that 59 pairs of primers were able to amplify DNA generating total 379 amplicons. The polymorphic data was used to create dendrogram based on Jaccard's similarity index through UPGMA. The results revealed the similarity index ranged from 0.69 to 0.95. Studied plants could be divided into 3 groups with a similarity coefficient of 0.8, corresponding to the sweetness (% brix). The 220 of polymorphic bands were detected with a percentage of 58.05. Analysis of the relationship between molecular markers and sweetness trait showed thatCM01 (X174) marker was found to correlate with the sweetness of 87.07 percent, resulting from the use of primers, Neutral invertase 1 with Sa17_800. The results of genetic diversity and developed DNA markers in this study will assist breeding processes and selection of sweetness trait in *C. melo* L. to be more efficient, more accurate and faster.

Keywords: *Cucumis melo* L., TRAP-PCR, Genetic diversity, Molecular marker, sweetness

บทนำ

แตงกลุ่ม *Cucumis melo* L. (*C. melo* L.) ที่นิยมปลูกในประเทศไทย คือ พันธุ์แตงเมลอน (*C. melo* var. *cantalupensis*) และแตงไทย (*C. melo* var. *conomon*) เป็นพืชผักที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ โดยในปี 2559 พบว่ามีพื้นที่เพาะปลูกเพิ่มขึ้นจากปี 2558 และให้ผลผลิตมูลค่า 275 และ 26 ล้านบาทสำหรับแตงเมลอนและแตงไทย ตามลำดับ (Niyompanich, 2017) โดยแตงกลุ่มนี้มีความหลากหลายทางกายภาพ เช่น รูปร่าง ลวดลาย สีผิว สีเนื้อ และความหวาน ซึ่งแตงเมลอนส่วนใหญ่มีความหวานมากกว่าแตงไทย แต่มีความทนทานต่อโรคแมลง และความต้านทานต่อสภาพความแปรปรวนของสภาพอากาศน้อยกว่าแตงไทย (Akashi *et al*., 2002; Chiewchanpanich, 1993) จึงมีความต้องการพันธุ์แตงที่มีรสชาติดี ทนทานต่อโรคแมลง และสภาพอากาศ โดยการศึกษาความหวานต้องรอให้ผลผลิตสุกแก่เต็มที่ ทำให้ต้องใช้ระยะเวลานาน นอกจากนี้สภาพแวดล้อมยังมีผลต่อปริมาณความหวานของแตงได้ ส่วนการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสภาพแวดล้อมไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณความหวาน ดังนั้นหากมีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การจัดกลุ่ม และการคัดเลือกแตงด้วยความหวาน ก็จะทำให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกพันธุ์ตามลักษณะความหวานได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและไม่เสียเวลาในการปลูกทดสอบ ทำให้การคัดเลือกเป็นไปได้รวดเร็ว และแม่นยำมากขึ้น

เทคนิคทางชีวโมเลกุลหลายเทคนิคถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์ในแตงกลุ่ม *C. melo* L. เช่น เทคนิค AFLP, RAPD และ RFLP (Garcia-Mas *et al*., 2000) เทคนิค ISSR (Tira-umphon & Ketudat-Cairns, 2015) เทคนิค SSR (Kacar *et al*., 2012 ; Kohpayegani *et al*., 2008 ; Sheng *et al*., 2007) และลำดับเบสของบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) (Niyompanich *et al*., 2017) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้จะไม่จำเพาะต่อยีน และในปัจจุบันมีรายงานเทคนิคใหม่ที่จำเพาะกับยีน เช่น เทคนิค Start codon Target Polymorphism (ScoT) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ใกล้รหัสเริ่มต้น จำนวน 1 เส้น หลักการเดียวกับเทคนิค RAPD (Collard & Mackill, 2009) และเทคนิค Target Region Amplification Polymorphism- Polymerase Chain Reaction (TRAP-PCR)

เทคนิค TRAP-PCR พัฒนาจากหลักการของ sequence-relation amplification polymorphism (SRAP) โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์จำเพาะ (fixed primer) ที่ออกแบบจากลำดับเบสของยีนที่สนใจ กับไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) มีลำดับเบสเป็น AT หรือ GC จำนวนมาก (AT- or GC-rich core) ซึ่งจะจับบริเวณเอกซอนหรืออินทรอนของยีนแบบสุ่ม เทคนิค TRAP-PCR มีข้อดี คือ ใช้งานง่าย ให้ผลเที่ยงตรง ทำซ้ำได้ สามารถกำหนดลักษณะที่ศึกษาได้ และมีความหลากหลายสูง อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ต้องการข้อมูลลำดับเบสของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการศึกษา (Hu & Vick, 2003) ซึ่งในปัจจุบันมีการรายงานลำดับเบสของยีนจำนวนมาก ที่สามารถนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ เนื่องจากเทคนิค TRAP-PCR สามารถกำหนดยีนที่ต้องการ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน ทำให้เทคนิค TRAP นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช ดังที่มีรายงานในอ้อย (Suman *et al*., 2012; Alwalas *et al*., 2006; Arro, 2005) ถั่ว (Kumar *et al*., 2014) เจอราเนียม (Palumbo *et al*., 2007) และเห็ดหอม (Qiu *et al*., 2014; Miklas & Grunwald, 2006) การจำแนกสายพันธุ์พืชชนิดต่าง ๆ เช่น การจำแนกจัดกลุ่มผักกาดหอม (Hu *et al*., 2005, Miklas *et al*., 2006) และใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะที่ต้องการ ดังที่มีรายงานเทคนิค TRAP-PCR เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานต่อโรคในถั่ว (Liu *et al*., 2005; Miklas *et al*., 2006) ลักษณะเชิงปริมาณในข้าวสาลี (Liu *et al*., 2005)

ความหวานของผลเป็นลักษณะที่สำคัญของแตงเนื่องจากเป็นตัวกำหนดราคา จากการศึกษาในแตงเมลอนพบว่าความหวานเกี่ยวข้องกับปริมาณของน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส ซึ่งพบว่าในระยะเจริญเติบโตจะมีปริมาณซูโครสต่ำกว่ากลูโคส และฟรุกโตส เนื่องมาจากการสลายซูโครสเพื่อการเจริญเติบโต แต่ในระยะเก็บเกี่ยวปริมาณซูโครสสูงกว่ากลูโคสและฟรุกโตส ซึ่งพบว่าปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ invertases ที่จะลดลง โดยที่มีรายงานว่าเอนไซม์ sucrose-P-synthase (SPS), sucrose synthase (SUS) และ invertases เป็นหลักสำคัญในการสะสมน้ำตาล (Souza *et al*., 2013) อีกทั้งยังมีการศึกษาการทำงานเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมทาบอลิซึมของแตงเมลอน (*C. melo* L.) ในระยะต่างๆ ของการเจริญ พบเอนไซม์จำนวน 8 เอนไซม์ที่มีปริมาณแตกต่างกันระหว่างช่วงต้นและช่วงปลายของการพัฒนาผล (Dai *et al*., 2011) ยีนของเอนไซม์เหล่านี้จึงเป็นเป้าหมายที่จะนำมาใช้ในการศึกษานี้ โดยที่ยีนของเอนไซม์เหล่านี้มีรายงานลำดับเบสในฐานข้อมูลแตงเมลอน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำศึกษาความหลากหลายทาง

พันธุกรรมและการศึกษาความสัมพันธ์กับความหวานของแตงในกลุ่ม *C. melo* L. ด้วยเทคนิค TRAP-PCR โดยผลการศึกษาทั้งความหลากหลายทางพันธุกรรมและเครื่องหมายที่พบจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ของแตงกลุ่ม *C. melo* L. ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างพืช

ในการศึกษานี้ใช้พืชกลุ่มแตง *C. melo* L. จำนวน 17 สายพันธุ์ โดยเป็นกลุ่มแตงไทย (*C. melo* var *conomon*) จำนวน 12 ตัวอย่าง (M01 – M12) แตงเมลอน (*C. melo* var *cantalupensis*) จำนวน 5 ตัวอย่าง (M13 – M17) ซึ่งตัวอย่างแตงไทย M01 M02 M03 M07 M10 และ M11 รวบรวมได้จากจังหวัดลำปาง ตัวอย่าง M04 M09 และ M12 รวบรวมได้จากจังหวัดเชียงใหม่ ตัวอย่าง M05 M06 และ M08 รวบรวมได้จากจังหวัดเชียงราย ซึ่งแตงไทยและแตงเมลอนที่ใช้มีการจำแนกตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ซึ่งเป็นไปตามการศึกษาของ Niramit (1988) ตัวอย่าง M13 – M17 ได้จากบริษัทฮอติเจนเนติคส์รีเสิร์ช จำกัด และแตงกวา (*Cucumis sativus; C. sativus* L) จำนวน 2 ตัวอย่าง (M18 – M19) ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ (out group) โดยแตงไทยที่ใช้คาดว่าจะเป็นพันธุ์แท้ จำนวน 12 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 19 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

การสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอ

การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอทำได้โดยการนำใบอ่อนของแตงที่ใช้ในการศึกษาบดในไนโตรเจนเหลว แล้วสกัดดีเอ็นเอจากจีโนม (genomic DNA) ด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ (Hwang & Kim, 2000) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การวัดความหวานของผล

นำแตงกลุ่ม *C. melo* L. จำนวน 17 ตัวอย่างปลูกลงในแปลง โดยปลูกตัวอย่างละ 3 ต้น เมื่อผลผลิตสุกแก่เต็มที่ทำการตรวจวัดความหวาน (% brix) โดยการนำเนื้อแตงสุกมาคั้นแล้วหยดลงบนเครื่อง Hand refractometer บันทึกข้อมูลค่าเฉลี่ย % brix เป็นผลความหวานของแตงแต่ละตัวอย่าง โดยไม่มีการวัดความหวานในแตงกวาเนื่องจากใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

การออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค TRAP-PCR

เทคนิค TRAP- PCR จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด โดยชนิดแรกจะเป็นไพรเมอร์จำเพาะกับยีนที่สนใจ ซึ่งจะออกแบบจากยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมทาบอลิซึมของน้ำตาลที่มีรายงานจากเมลอน (Dai *et al*., 2011) จำนวน 9 ยีน โดยข้อมูลลำดับเบสของยีนเหล่านี้ได้จากฐานข้อมูล MELONOMICS (http://melonomics.net) ส่วนไพรเมอร์อีกชนิดเป็นไพรเมอร์แบบสุ่มที่ออกแบบจากหลักการของ (Li & Quiros, 2001) จำนวน 12 ไพรเมอร์

ตารางที่ 1 กลุ่มตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษานี้

ตัวอย่างที่	รหัส	ฟีโนไทป์	แหล่งที่มา	ความหวาน (% brix)
1	M01	แตงไทย	ลำปาง	3.3
2	M02	แตงไทย	ลำปาง	5.0
3	M03	แตงไทย	ลำปาง	5.3
4	M04	แตงไทย	เชียงใหม่	5.0
5	M05	แตงไทย	เชียงราย	5.3
6	M06	แตงไทย	เชียงราย	6.0
7	M07	แตงไทย	ลำปาง	5.3
8	M08	แตงไทย	เชียงราย	5.0
9	M09	แตงไทย	เชียงใหม่	4.3
10	M10	แตงไทย	ลำปาง	5.0
11	M11	แตงไทย	ลำปาง	6.0
12	M12	แตงไทย	เชียงใหม่	6.0
13	M13	แตงเมลอน	บริษัทฮอทิเจนเนติคส์รีเสิร์ช จำกัด	12.0
14	M14	แตงเมลอน	บริษัทฮอทิเจนเนติคส์รีเสิร์ช จำกัด	10.3
15	M15	แตงเมลอน	บริษัทฮอทิเจนเนติคส์รีเสิร์ช จำกัด	14.0
16	M16	แตงเมลอน	บริษัทฮอทิเจนเนติคส์รีเสิร์ช จำกัด	18.0
17	M17	แตงเมลอน	บริษัทฮอทิเจนเนติคส์รีเสิร์ช จำกัด	18.0
18	M18	แตงกวาหอม	แพร่	ไม่วิเคราะห์
19	M19	แตงกวาหนาม	บริษัทนันฮีมจำกัด	ไม่วิเคราะห์

ในการศึกษานี้ทำปฏิกิริยา TRAP-PCR เป็น 104 ปฏิกิริยา จากไพรเมอร์ 104 คู่ ที่ได้จากการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์จำเพาะและไพรเมอร์แบบสุ่ม ในการทำปฏิกิริยา PCR มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม บัฟเฟอร์สำเร็จรูป 1x GeNei™ Red Dye PCR Master Mix (Merck, USA) และ 0.5 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์แต่ละชนิด โดยใช้สภาวะอุณหภูมิดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที ตามด้วย 5 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 35 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และต่อด้วย 40 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที (Hu & Vick, 2003) วิเคราะห์ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค 1.5 % agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตง โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษา ตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ให้คะแนนเป็น 1 สำหรับตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันให้คะแนนเป็น 0 จากนั้นจึงนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc.รุ่น 2.0 (Mukunda Lakshmi & Linglilh, 2017) และศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) โดยอาศัยสัมประสิทธิ์ความเหมือนตามวิธี Jaccard (1908) ด้วยโปรแกรม TreeView

การวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะความหวาน

นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค TRAP-PCR มาวิเคราะห์หาความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะความหวาน ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ความเชื่อมโยงระหว่างลักษณะความหวานกับเครื่องหมายโมเลกุลวิธี Simple linear regression และการวิเคราะห์สมการถดถอยหลายตำแหน่ง (Multiple-locus regression)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การสกัดดีเอ็นเอจากจีโนม

การสกัดดีเอ็นเอจากจีโนม เมื่อนำวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ขนาดมากกว่า 20 กิโลเบส (ไม่แสดงข้อมูล) แสดงว่าดีเอ็นเอมีความสมบูรณ์ สามารถนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) แล้วเจือจางให้แต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

การออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค TRAP-PCR

เทคนิค TRAP-PCR จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด โดยชนิดแรกจะเป็นไพรเมอร์จำเพาะกับยีน โดยออกแบบจากยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมทาบอลิซึมของน้ำตาล จำนวน 9 ยีน ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวกับวิถีการสร้างและสลายน้ำตาลในแตงเมลอน (Dai *et al*., 2011) โดยชื่อของยีนหรือเอนไซม์ ชื่อย่อย รหัสของลำดับเบสในฐานข้อมูล MELONOMICS (Garcia-Mas *et al*., 2012) ที่ใช้ในการออกแบบและลำดับเบสของไพรเมอร์จำเพาะดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 ส่วนไพรเมอร์อีกชนิดเป็นไพรเมอร์แบบสุ่มที่ จำนวน 12 ไพรเมอร์ แสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 โดยจาก ไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค TRAP–PCR จะแสดงความแตกต่างในบริเวณที่เป็นเอกซอนหรืออินทรอนของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษา (Alwalas *et al*., 2006)

เมื่อนำดีเอ็นเอของแตงที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค TRAP-PCR ด้วยไพรเมอร์ TRAP จำนวน 104 คู่ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้แถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ จำนวน 71 คู่ จากนั้นคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แยกได้ชัดเจนและจำนวนไม่มาก ได้ไพรเมอร์ จำนวน 59 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 379 แถบ ซึ่งแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มจำนวนด้วย

ไพรเมอร์เหล่านี้ จะนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างระหว่างตัวอย่างแตงทั้ง 19 ตัวอย่าง (monomorphic bands) จำนวน 159 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างตัวอย่างแตงทั้ง 19 ตัวอย่าง (polymorphic bands) จำนวน 220 แถบ คำนวณแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างเป็น 58.05 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค TRAP-PCR ของไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ เช่น ไพรเมอร์ PGMcyt กับ Ga3-800 ไพรเมอร์ PGMcyt กับ Odd3-800 ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 220 แถบเหล่านี้ จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงเครื่องหมายโมเลกุลกับความหวานต่อไป โดยให้เป็นหมายเลขตามลำดับของแถบ ได้เป็น X1-X220 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 รายละเอียดของไพรเมอร์จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีเมทาบอลิซึมของน้ำตาล

Gene/Enzyme name	**ชื่อย่อ**	Melon ID	**ลำดับเบส** (5′-3′)
Acid α-galactosidase 1	AAG1	MELO3C005560P1	GCCTCATCATGTGAGC
Fructokinase 1	FK1	MELO3C020278P1	GAGAGGAGCCATTCCTGC
Hexokinase 1	HK1	MELO3C004591P1	GATGGAGGGTTCTATGAGC
Neutral invertase 1	NIN1	MELO3C006727P1	GACTCAGGATTCTGGTGG
Phosphoglucose isomerase; cyt *	PGIcyt	MELO3C010936P1	CAAGACCCATCTACGTGC
Phosphoglucomutase; cyt*	PGMcyt	MELO3C005293P1	ACTCCTTCAGACTCTGTTGC
Sucrose-P-synthase 1	SPS1	MELO3C010300P1	ATGGAGCTTGGCGTGATTCTG
Sucrose synthase 1	SUS1	MELO3C015552P1	ACAGTTGTGGAGGCCATG
UDP-glc/gal pyrophosphorylase	UGGP	MELO3C008467P1	GGATTCAGACCAAGCCTC

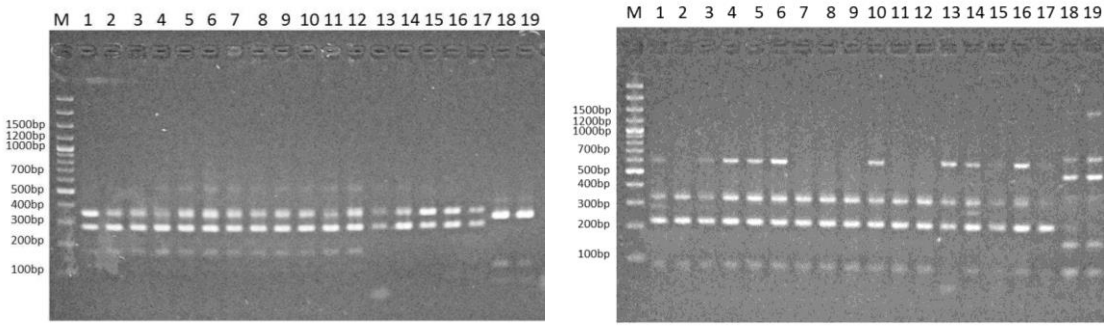
* ยีนจากไซโทพลาสซึม

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์แบบสุ่มใน TRAP-PCR (Hu, 2006)

ชื่อ	**ลำดับเบส** (5′-3′)	**ชื่อ**	**ลำดับเบส** (5′-3′)
Trap03-700	CGTAGCGCGTCAATTATG	Odd26-700	CTATCTCTCGGGACCAAAC
Trap04-700	CGTAGTGATCGAATTCTG	Sa04-700	TTCTTCTTCCCTGGACACTT
Trap13-800	GCGCGATGATAAATTATC	Sa12-700	TTCTAGGTAATCCAACAACA
Trap14-800	GTCGTACGTAGAATTCCT	Sa17-800	ATAAGAATCAGCAGACGCAT
Odd3-800	CCAAAACCTAAAACCAGGA	Ga3-800	TCATCTCAAACCATCTACAC
Odd15-700	GCGAGGATGCTACTGGTT	Ga5-800	GGAACCAAACACATGAAGA

การวัดความหวานของผล

เมื่อนำผลสุกแก่จัดของแตงกลุ่ม *C. melo* L. จำนวน 17 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 3 ต้น มาวัดความหวานด้วยเครื่อง Hand refractometer บันทึกข้อมูลเป็น % brix เป็นผลความหวานของแตงแต่ละตัวอย่าง แสดงข้อมูลค่าเฉลี่ยความหวาน (% brix) ดังแสดงในตารางที่ 1



(ก) (ข)

ภาพที่ 1 ผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis ของผลผลิตของ TRAP-PCR ที่ได้จาก (ก) ไพรเมอร์ Phosphoglucomutase; cyt (PGMcyt) กับ Ga3-800 และ (ข) ไพรเมอร์ PGMcyt กับ Odd3-800 โดยใช้กระแส 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง โดยที่ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ช่อง 1-12 เป็นดีเอ็นเอของแตงไทย M01-M12 ช่อง 13-17 เป็นดีเอ็นเอของแตงเมลอน M13-M17 และช่องที่ 18-19 เป็นดีเอ็นเอของแตงกวา M18-19

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

จากการนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ จำนวน 59 คู่ มาวิเคราะห์หาค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity index) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าแตงกลุ่ม *C. melo* L. จำนวน 17 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.69 ถึง 0.95 ในขณะที่มีค่าดัชนีความเหมือนกับแตงกวา (*C. sativus* L.) เป็น 0.3-0.39 ดังแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งหากเปรียบเทียบภายในตัวอย่างพบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน ระหว่าง 0.78-0.95 สำหรับแตงไทย และ 0.63-0.85 สำหรับแตงเมลอน แสดงให้เห็นว่าแตงไทยที่ใช้ในการศึกษานี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยกว่าแตงเมลอน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มตัวอย่างด้วยเทคนิค RAPD ที่พบว่าค่าดัชนีความเหมือนของแตงไทยและแตงเมลอน เป็น 0.75-1 และ 0.25-0.83 ตามลำดับ (Inchonbot *et al*., 2015) ที่อาจเนื่องจากแตงเมลอนนั้นมีการศึกษาและการปรับปรุงพันธุ์อย่างแพร่หลาย ซึ่งในขณะที่แตงไทยนั้น ยังไม่มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์

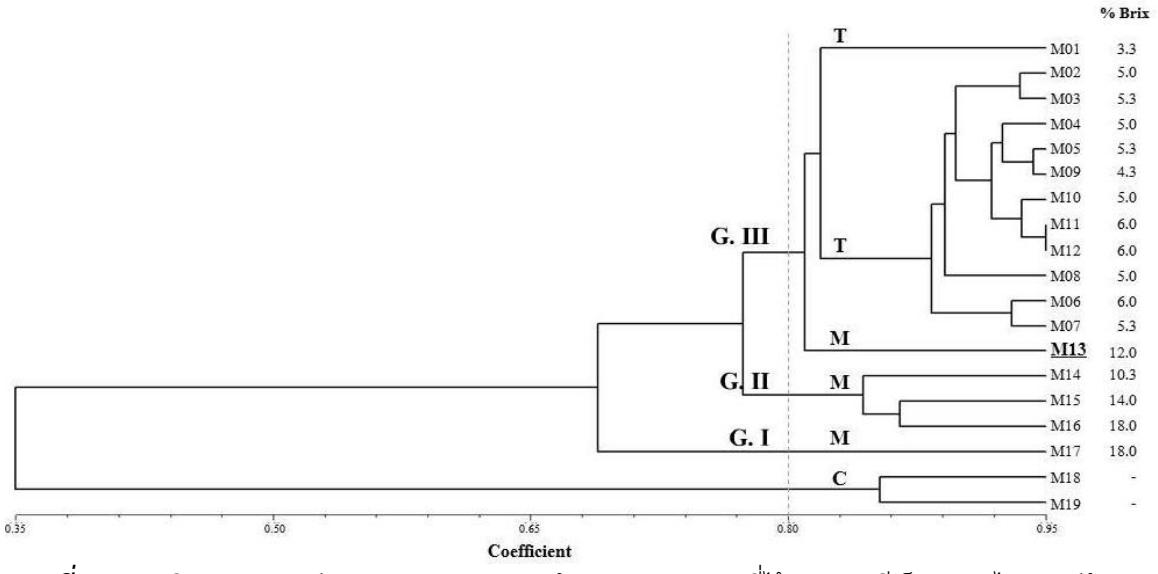
ผลจากการจัดกลุ่มด้วยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) แสดงในภาพที่ 2 โดยจากแผนภูมิความสัมพันธ์นี้แบ่งกลุ่มแตง *C. melo* L. ที่ค่าสัมประสิทธ์ความเหมือน Jaccard (coefficient) เท่ากับ 0.8 สามารถจัดกลุ่มแตงออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 คือ แตงเมลอน M17 กลุ่มที่ 2 คือ แตงเมลอน จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ M14 M15 และ M16 กลุ่มที่ 3 คือ แตงไทย M01-12 และแตงเมลอน M13 ซึ่งจากการแบ่งกลุ่มดังกล่าวพบว่าสอดคล้องกับความหวาน โดยแตงกลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นแตงกลุ่มเมลอนที่มีความหวานค่อนข้างสูงมากกว่า10% brix กลุ่มที่ 3 เป็นแตงกลุ่มแตงไทย

มีความหวานอยู่ที่ระดับต่ำกว่า 10% brix ยกเว้นแตงเมลอน M13 ที่มีความหวาน 12% brix แต่ยังจัดอยู่ในกลุ่มแตงไทย อาจเนื่องมาจากมีลักษณะต้น (ข้อมูลไม่เป็นทางการจากบริษัท) ลักษณะผิวผล และลักษณะของเนื้อภายในเหมือนกับแตงไทยมากกว่าแตงเมลอน ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยที่ผลการจัดกลุ่มแตงนี้ให้ผลเช่นเดียวกับการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค RAPD ที่พบว่าสามารถแยกกลุ่มแตงไทย แตงเมลอน และแตงกวาได้ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน เท่ากับ 0.89 ได้ แต่เมื่อพิจารณาในแต่ละกลุ่ม พบว่าการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค TRAP-PCR สามารถแยกตัวอย่าง M13 ออกจากตัวอย่างแตงไทยอื่น ๆ ได้ชัดเจน ในขณะที่การจัดกลุ่มด้วยเทคนิค RAPD ตัวอย่าง M13 ถูกจัดกลุ่มอยู่กับตัวอย่าง M01 M02 และ M12 (Inchonbot *et al*., 2015)

ตารางที่ 4 ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity index) ของตัวอย่างแตงจำนวน 19 ตัวอย่าง

M01	-																	
M02	0.85	-																
M03	0.89	0.93	-															
M04	0.83	0.92	0.91	-														
M05	0.82	0.90	0.90	0.93	-													
M06	0.80	0.89	0.88	0.90	0.94	-												
M07	0.78	0.87	0.83	0.87	0.88	0.93	-											
M08	0.78	0.88	0.87	0.89	0.90	0.90	0.86	-										
M09	0.79	0.88	0.86	0.92	0.94	0.90	0.88	0.90	-									
M10	0.82	0.91	0.89	0.92	0.93	0.91	0.86	0.89	0.93	-								
M11	0.81	0.90	0.89	0.91	0.90	0.89	0.85	0.88	0.91	0.93	-							
M12	0.79	0.89	0.87	0.90	0.90	0.89	0.85	0.90	0.93	0.93	0.95	-						
M13	0.73	0.80	0.77	0.81	0.84	0.82	0.78	0.80	0.84	0.83	0.81	0.85	-					
M14	0.75	0.80	0.80	0.80	0.79	0.78	0.73	0.79	0.77	0.79	0.82	0.81	0.77	-				
M15	0.74	0.80	0.77	0.78	0.77	0.77	0.75	0.79	0.77	0.80	0.79	0.78	0.77	0.84	-			
M16	0.77	0.77	0.76	0.77	0.73	0.75	0.71	0.77	0.75	0.77	0.77	0.76	0.76	0.84	0.86	-		
M17	0.73	0.72	0.71	0.69	0.64	0.63	0.64	0.69	0.66	0.67	0.68	0.66	0.63	0.70	0.77	0.81	-	
M18	0.41	0.39	0.36	0.39	0.35	0.35	0.38	0.37	0.38	0.37	0.35	0.38	0.34	0.35	0.39	0.38	0.45	-
M19	0.39	0.35	0.34	0.34	0.32	0.32	0.36	0.32	0.35	0.34	0.31	0.33	0.30	0.31	0.33	0.33	0.38	0.85
	M01	M02	M03	M04	M05	M06	M07	M08	M09	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18

จึงจะเห็นได้ว่าการศึกษาความหลากหลายของแตงด้วยเทคนิค TRAP-PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะกับยีนที่เกี่ยวข้องกับความหวาน จะให้ผลการจัดกลุ่มสอดคล้องกับความหวานเช่นกัน ทำให้ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจะเป็นไปตามลักษณะตามที่ยีนที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ดังที่พบจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของอ้อยด้วยเทคนิค TRAP ด้วยยีนที่เกี่ยวกับการสร้างลิกนิน ซึ่งพบความสัมพันธ์ของพันธุ์อ้อยกับมวลชีวภาพ (Suman *et al*., 2012)



ภาพที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแตง จำนวน 19 ตัวอย่างที่ได้จากแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์จำนวน 59 คู่ ของเทคนิค TRAP-PCR ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc โดยที่ C, M และ T คือ แตงกวา, แตง, เมลอน และ แตงไทย ตามลำดับ ส่วน G.I-G.III คือ กลุ่มที่ 1-3 ตามลำดับ

ภาพที่ 3 ลักษณะผลของแตงเมลอน M13 ที่มีผิวเปลือกบาง ลักษณะผลและลวดลายบนผิวผลคล้ายแตงไทยในภาคเหนือ เมล็ดมีขนาดเล็กเหมือนแตงไทยทั่วไป

การวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะความหวาน

นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค TRAP-PCR จำนวน 220 แถบมาวิเคราะห์หาความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะความหวาน ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ด้วยวิธี Simple linear regression โดยแต่ละแถบเป็นแต่ละเครื่องหมาย ดังนั้น แถบดีเอ็นเอ 220 แถบ จึงเป็นเครื่องหมาย จำนวน 220 เครื่องหมาย ผลการวิเคราะห์พบเครื่องหมายจำนวน 43 เครื่องหมายแสดงความเชื่อมโยงกับความหวานอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) (ไม่แสดงข้อมูล)และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Multiple locus regression พบว่ามี 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย CM01 (X174) และCM02 (X51) ที่แสดงความเชื่อมโยงกับความหวานอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.0001) ซึ่งมีอิทธิพลกับความหวานเป็น 87.07 และ 9.52 เปอร์เซ็นต์

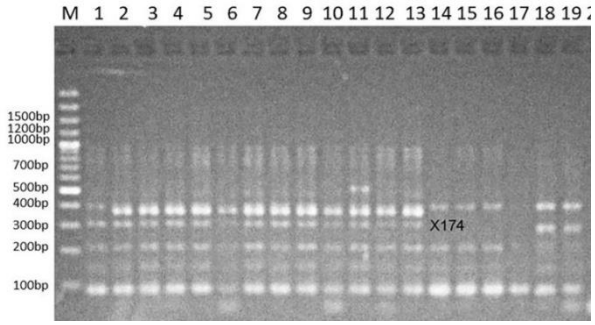
ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยเครื่องหมาย CM01 (X174) เป็นเครื่องหมายที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ Neutral invertase 1 กับ Sa17_800 (ภาพที่ 4) และCM02 (X51) เป็นเครื่องหมายที่พบได้จากเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ Sucrose-P-synthase 1 กับ Sa12_700 จากภาพที่ 4 พบแถบเครื่องหมาย X174 ในตัวอย่างแตงไทย M01-M12 และแตงเมลอน M13 แถบดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่าแตงเมลอน M13 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับแตงไทยมากกว่าแตงเมลอน ซึ่งผลสอดคล้องกับแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ multiple locus regression ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างทางสถิติและความเชื่อมโยงกับลักษณะความหวาน

ลำดับที่	แถบดีเอ็นเอ	Partial R^2	*P* -value
1	CM01 (X174)	0.8707	0.0002
2	CM02 (X51)	0.0952	0.0064

โดยเครื่องหมาย CM01 นั้นเป็นแถบจากยีน Neutral invertase 1 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณของเอนไซม์ต่างๆ และการแสดงออกของยีนในแตงเมลอน พบว่าเอนไซม์ invertase จะมีปริมาณลดลงหรือมีการแสดงออกของยีนลดลงในระยะท้ายของการพัฒนาของผล (Dai *et al*., 2011; Souza *et al*., 2013; Saladie *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2016; Kong *et al*., 2016) และมีรายงานเทคนิค TRAP ในการศึกษาพันธุกรรมของอ้อยพันธุ์ต่าง ๆ พบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ของยีน Acid invertase สามารถใช้เป็นเครื่องหมายกับความหวานของอ้อย (Khan *et al*., 2011)

ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาได้นี้น่าจะสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์แตงให้มีความหวานมากยิ่งขึ้นต่อไป



ภาพที่ 4 ผลการทำ 1.5% agarose gel electrophoresis ของผลผลิตของ TRAP-PCR ที่ได้จาก ไพรเมอร์ Neutral invertase 1 กับ Sa17_800 โดยที่ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ช่อง 1-12 เป็นดีเอ็นเอของแตงไทย M01-M12 ช่อง 13-17 เป็นดีเอ็นเอของแตงเมลอน M13-M17 และช่องที่ 18-19 เป็นเป็นดีเอ็นเอของแตงกวา M18-19 โดยที่พบแถบดีเอ็นเอ X174 จากตัวอย่างแตงกลุ่ม *C. melo* L. ที่ M01-M13 เท่านั้น

สรุปผลการวิจัย

การงานวิจัยนี้ใช้เทคนิค TRAP-PCR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแตงในกลุ่ม *C. melo* L. โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากยีนในวิถีเมทาบอลิซึมของน้ำตาล จำนวน 9 ยีน ร่วมกับไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 12 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ จำนวน 59 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณให้แถบดีเอ็นเอที่เหมะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากแถบดีเอ็นเอ จำนวน 379 แถบ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างตัวอย่างแตงทั้ง 19 ตัวอย่าง (polymorphic bands) จำนวน 220 แถบ (58.05 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.69 ถึง 0.95 และจากแผนภูมิความสัมพันธ์สามารถแบ่งกลุ่มแตง *C. melo* L. ออกเป็น 3 กลุ่ม

การศึกษาความเชื่อมโยงของเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะความหวาน จากแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง จำนวน 220 แถบ พบว่ามี 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย CM01 (X174) และCM02 (X51) ที่แสดงความเชื่อมโยงกับความหวาน ซึ่งมีอิทธิพลกับความหวานเป็น 87.07 และ 9.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเครื่องหมาย CM01 (X174) เป็นเครื่องหมายที่ได้จากการเพิ่มจำนวนของไพรเมอร์ Neutral invertase 1 กับ Sa17_800 และ CM02 (X51) เป็นเครื่องหมายที่พบได้จากเพิ่มจำนวนของ ไพรเมอร์ Sucrose-P-synthase 1 กับ Sa12_700 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาได้เหล่านี้จะสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ของแตงกลุ่ม *C. melo* L. ต่อลักษณะความหวานให้มีประสิทธิภาพ แม่นยำ และรวดเร็วมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จานุลักษณ์ ขนบดี สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดแตงไทย M01 - M03 และ บริษัทฮอรทิเจนเนติคส์รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดแตงเมลอน M13 – M17 สำหรับการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Akashi, Y., Fukuda, N., Masuda, M., & Kato, K. (2002). Genetic variation and phylogenetic relationships in East and South Asian Melons *Cucumis melo* L., based on the analysis of five isozymes. *Euphytica*, *125*, 385-396.

Alwala, S., Suman, Arro, J.A., Veremis, J.C., & Kimbeng, C.A. (2006). Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop Sci, 46*, 448-455.

Arro, J. A. (2005). *Genetic diversity among sugarcane clones using target region amplification polymorphism (TRAP) markers and pedigree relationships*. Retrieved January 12, 2018, from http://digitalcommons. lsu.edu/gradschool_theses/1094.

Burger, Y., Sa'ar, U., Distelfeld, A., Katzir, N., Yeselson, Y., Shen, S., & Schaffer, A.A. (2003). Development of sweet melon (*Cucumis melon* L.) genotypes combining high sucrose and organic acid content. *J. Amer. Soc HORT. Sci,128,* 537-540.

Chiewchanpanich, V. (1993). *Varietal studies and yield trial of melon (Cucumis melo* var. *conomon)*. Retrieved June 15,2017, from http:// www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/Horticulture/2536/Bs/.../ WorranuchChAll.pdf. (in Thai)

Collard, B.C.Y. & Mackill, D.J., 2009, Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple,novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants, *Plant Mol. Biol. Rep*, *27*, 86-93.

Dai. N., Cohen, S., Portnoy, V., Tzuri, G., Harel-Beja, R., Pompan-Lotan, M., Carmi, N., Zhang, G., Diber, A., Pollock, S., Karchi, H., Yeselson, Y., Petreikov, M., Shen, S., Sahar, U., Hovav, R., Lewinsohn, E., Tadmor, Y., Granot, D., Ophir, R., Sherman, A., Fei, Z., Giovannoni, J., Burger, Y., Katzir, N., & Schaffer, A.A. (2011). Metabolism of soluble sugars in developing melon fruit: a global transcriptional view of the metabolic transition to sucrose accumulation. *Plant Mol Biol*, *76*, 1–18.

Garcia-Mas, J., Oliver, M., Gómez-Paniagua, H., & de Vicente, M.C. (2000). Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor Appl Genet*, *101,* 860-864.

Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M,. Mir, G., Gonzalez, V.M., Henaff, E., Camara, F., Cozzuto, L., Lowy, E., Alioto, T., Capella-Gutiérrez, S., Blanca, J., Canizares, J., Ziarsolo, P., Gonzalez-Ibeas, D., Rodríguez-Moreno, L., Droege, M., Du, L., Alvarez-Tejado, M., Lorente-Galdos, B., Mele, M., Yang, L., Weng, Y., Navarr, A., Marques-Bonet, T., Aranda, M.A., Nuez, F., Pico, B., Gabaldon, T., Roma, G., Guigo, R., Casacuberta, J.M., Arus, P., & Puigdomènech, P. (2012). The genome of melon (Cucumis melo L.). *PNAS, 29* (109), 11872 – 11877.

Hu, J., & Vick, B.A. (2003). Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Mol. Biol. Rep, 21,* 289-294.

Hu, J., Ochoa, O.E., Truco, M.J., & Vick, B.A. (2005). Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. *Euphytica, 144,* 225–235.

Hu, J. (2006). Defining the sunflower (*Helianthus annuus* L.) linkage group ends with the Arabidopsis-type telomere sequence repeat-derived markers. *Chromosome Research, 14,* 535–548.

Hwang, S.K., & Kim, Y. M. (2000). A simple and reliable method for preparation of cross-contamination free plant genome DNA for PCR-based detection of transgenes. *Journal of biochemistry and molecular biology, 33,* 537-546.

Inchonbot, S., Sakulsingharoj, C., Sangtong, V., Puddhanon, P., & Pongjaroenkit , S. (2015). Genetic diversity study of *Cucumis melo* L. by Random Amplification of Polymorphic DNA(RAPD) Technique. In *Proceeding of 19th National Genetics Conference* . (pp.314-319). Khonkaen University: kkuprinting. (in Thai)

Kacar, Y.A., Simsek, O., Solmaz, I., Sari, N., & Mendi, Y.Y. (2012). Genetic diversity among melon accessions (*Cucumis melo*) from Turkey based on SSR markers. *Genet Mol Res, 11,* 622–4631.

Khan, I.A., Bibi, S., Yasmeen, S., Seema, N., Khatri, A., Siddioui, M.A., Nizamani, G.S. & Afghan, S. 2011. Identification of elite sugarcane clones through TRAP. *Pak. J. Bot., 43*(1), 261-269.

Kohpayegani, J.A., & Behbahani, M. (2008). Genetic diversity of some populations of Iranian melon using SSR markers. *Biotechnology, 7,* 19-26.

Kong, Q., Gao, L., Cao, L., Liu, Y., Saba, H., Huang, Y., & Bie, Z. (2016). Assessment of suitable reference genes for quantitative gene expression studies in melon fruits. *Plant science, 7,* 1-10.

Kumar, Y., Kwon, S. J., Coyne, C. J., Hu, J., Kisha, T. J., Grusak, M. A., McGee, R. J., & Sarker, A. (2014). Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity and marker-trait associations in chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. *Genet Resour Crop Evol*, *61,* 965-977.

Li, G. & Quiros, C.F (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor Appl Genet, 103,* 455–461.

Liu, Z.H., Anderson, J.A., Hu, J., Friesen, T.L., Rasmussen, J.B., & Faris, J.D. (2005). A wheat intervarietal linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci. *Theor. Appl. Gene, 111*, 782–794.

Miklas, P.N., Kelly, J.D., Beebe, S.E., & Blair, M.W. (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: from classical to MAS breeding, *Euphytica 147,* 105-131.

Miklas, P.N., Hu, J., Grunwald, N.J., & Larsen, K.M. (2006). Potential application of TRAP markers for tagging disease resistance traits in common bean. *Crop Sci, 46,* 910-916.

Mukunda Lakshmi, L., Mohan Rao A. Ramesh, A., & Lingaiah, H.B. (2017). RAPD Molecular Marker Based Genetic Diversity among Oriental Pickling Melon (*Cucumis melo* var. *conomon*) Genotypes in Karnataka, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, *6*(3), 324-330.

Niramit Kitroongruang. 1988. *A study of F_1 Hybrid Characters of Muskmelo* (*Cucumis melo* L.) .Thesis. Chiang Mai University.

Niyompanich, S., Binchai. S., Pringsulaka, O., & Rangsiruji, A. (2017). Clustering and Genetic Divesity Assessment of Economic Cultivars of Melons (*Cucumis melo* L.) Using Molecular Techniques. *Srinakharinwirot University Science Journal*, *33*(2), 71-87. (in Thai)

Palumbo, R., Hong, W.F., Wang, G.L., Hu, J., Craig, R., Locke, J., Krause, C., & Tay, D. (2007). Target region amplification polymorphism (TRAP) as a tool for detecting genetic variation in the genus pelargonium. *Hortscience*, *42*(5), 1118-1123.

Qiu, C., Wenjuan, Y., Wangqiu, D., Bin, S., & Taihui, L. (2014). Genetic diversity analysis of *Hypsizygus marmoreus* with target region amplification polymorphism. *The Scientific World Journal*, *2014,* 1-7.

Saladie, M., Canizares, J., Phillips, M.A., Rodriguez-Concepcion, M., Larrigaudiere, C., Gibon, Y., Stitt, M., Lunn, J.E., & Garcia-Mas, J. (2015). Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. *BMC Genomics*, *16,* 440 (1-20).

Sheng, Y., Luan, F., Chen, K., Cui, X., & Staub, J.E. (2007). Genetic diversity of chinese thin-skinned melon cultivars (*Cucumis melo* L.) Based on simple sequence repeat markers. *Acta Hort, 763,* 169-176.

Souza, P.A., Adriano Nascimento Simões, A.N., Puiatti, M., Gomes, J., & Vieira, M.R. (2013). Carbohydrate metabolism and quality of fruits from the Cucumis genus. *Academia Journal of Agricultural Research, 1*(7), 101-105.

Suman, A., Ali, K., Arro, J., Arnold, S., Parco, A.S., Kimbeng, C. A., & Baisakh, N. (2012). Molecular diversity among members of the Saccharum complex assessed using TRAP markers based on lignin-related genes. *Bioenerg.Res, 5,* 197-205.

Tira-umphon, A., & Ketudat-Cairns, M. (2015). *Genetic Variation and Morphological Traits in Melon and Pickling Melon from ISSR.* Retrieved Mach 18, 2017, from http://www.sutir.sut.ac.th.8080/sutir/ bitstream/ 123456789/5894/1/Fulltext.pdf (in Thai)

Xiao, Y., Liu, W., Lu, Y.Y., Gong, W.B., & Bian, Y.B. (2010). Applying target region amplification polymorphism markers for analyzing genetic diversity of Lentinula edodes in China. *Journal of Basic Microbiology, 50*, 1-9.

Zhang, H., Wang, H., Yi, H., Zhai, W., Wang, G., & Fu, Q. (2016). Transcriptome profiling of *Cucucmis melo* fruit development and ripening. *Horticulture Research, 3,* 16014.